

Oponentský posudek magisterské práce

Bc. Barbora Plačková: Touha po cukru, fyziologické procesy klíštěte *Ixodes ricinus* v závislosti na hostitelské glukóze

Cílem magisterská práce Barbory Plačkové bylo charakterizovat glukózové transportéry klíštěte *Ixodes ricinus*. Téma je to bezesporu důležité a zajímavé, tyto proteiny nebyly u klíštěte dosud charakterizovány, a můžeme u nich očekávat významnou roli ve fyziologii a metabolismu klíštěte.

V práci bylo identifikováno šest genů kódujících glukózové transportéry. Byly charakterizovány pomocí kvantitativní PCR ve třech různých orgánech a v různém čase po sání klíšťat. S cílem určit jejich nezbytnost byly targetovány pomocí RNAi. Tyto pokusy byly doplněny komplementárním experimentem s použitím známých inhibitorů glukózových transportérů a 2-deoxyglukózy, inhibitoru glykolýzy.

Rozsahem je práce odpovídající pro magisterskou práci, Barbora použila širokou škálu metod od pokročilých metod molekulární biologie, po RNAi u klíšťat nebo membránové sání klíšťat. Kvalita experimentální části bohužel není dodržena v písemném projevu a kritickým vyhodnocením výsledků. Práce je napsaná neobratně, obsahuje řadu formulací, které jsou matoucí nebo přímo nesprávné. Úvodní anotace obsahuje tvrzení, která z práce nevyplývají.

Úvod je značně stručný, chybí například jakýkoliv popis klíštěte, v přehledu současné literatury o trávení u klíštěte chybí důležité publikace. Naopak, metodická část je napsána velmi podrobně a pečlivě. Z výsledků bych vyzvedla grafy, které jsou zpracované výborně, v publikační kvalitě. Kvantitativní PCR analýzy byly provedeny velmi pečlivě a přinášejí zajímavé výsledky, o to větší je škoda, že jejich vyhodnocení je ošizené. Diskuze je příliš stručná. RNAi je zjednodušeně vyhodnocena jako nefunkční, namísto toho, aby autorka okomentovala případy, které fungovaly, a zhodnotila možné příčiny. Rozdíly v expresi jednotlivých genů v tkáních a čase nejsou okomentované vůbec. Podobně i v závěru jsou výsledky zjednodušené a nepřesně interpretované. Autorka by se měla snažit hledat rozdíly mezi jednotlivými geny, místo toho vyvozuje nepřesné všeobecné závěry.

Otázky

- Proč má klíště šest genů pro glukózové transportéry? Co můžeme usuzovat na základě znalosti jiných organismů a Vašich výsledků o jejich funkci, charakteristice atd.?
- Jakou roli hrají glukózové transportéry ve střevě? Na schématu střevních buněk s glukózovými transportéry popište, jak je glukóza vstřebávána z potravy a transportována do všech buněk těla. Pokud chybí odborná literatura, budeme předpokládat, že v principu se u klíštěte uplatňují stejné mechanismy jako u jiných organismů. Jak se liší funkce glukózových transportérů ve střevě a v ostatních tkáních?
- Pro navržení PCR nemůžete použít proteinovou sekvenci (Obr. 4 a 5). Udělejte alignment DNA sekvencí všech GLUT genů dohromady a vyznačte úseky použité pro RT-PCR a úseky pro RNAi.

- Jak funguje GFP kontrola pro RNAi? V práci chybí bližší popis nebo zdroj GFP klíčtat. Na základě čeho jsou spárované GLUT geny s danými profily GFP?
- Ve výsledcích experimentu s 2-deoxyglukózou uvádíte ‚značně velký rozdíl‘. Jak velký? Je statisticky signifikantní?

Drobné připomínky

Obr. 2 – špatný popis

Str. 25 – Obrázky by měly být použity v textu postupně 6, 7, 8, 9.

Obr. 10 – Bylo by lepší popsat vzorky nad gelem a uvést velikosti markeru, velikost produktů vzbuzuje v některých případech pochybnosti.

Obr. 10 – Restrikční enzymy *ApaI* a *XbaI* se neskloňují.

Str. 41 – Není možné porovnávat expresi genů navzájem, navíc je uvedený špatný odkaz na obrázek.

V Českých Budějovicích dne 1. července 2020

Julie Kovářová, Ph.D.